

ROBERT BOROWIAK, GRZEGORZ LEŚNIEWSKI

PRÓBA ZWIĘKSZENIA FUNKCJONALNOŚCI PREPARATÓW OTRZYMANÝCH METODĄ WYSOKOTEMPERATUROWEJ MODYFIKACJI LIZOZYMU

Streszczenie

Lizozym jest enzymem hydrolitycznym o silnym działaniu przeciwbakteryjnym, a jego modyfikacja dodatkowo wzmacnia to działanie. Zmodyfikowany enzym wykazuje zwiększoną użyteczność, co umożliwia jego szersze praktyczne wykorzystanie. W dotychczasowych badaniach nad lizozymem opracowano kilka metod jego modyfikacji w tym termiczne i termiczno-chemiczne. Efektem ubocznym tego typu modyfikacji jest częściowa nieodwracalna denaturacja enzymu. Wpływa ona na pogorszenie właściwości zmodyfikowanego lizozymu, a w wyniku zmniejszenia jego rozpuszczalności w środowisku wodnym ogranicza praktyczne zastosowanie otrzymanych preparatów. Celem pracy była próba zwiększenia funkcjonalności termicznie zmodyfikowanego enzymu poprzez wyeliminowanie z preparatu frakcji nierozpuszczalnej. W wyniku frakcjonowania w środowisku obojętnym otrzymano preparat o całkowitej rozpuszczalności i aktywności hydrolitycznej 10 000 U/mg. Najwyższą wydajność procesu frakcjonowania (75 %) uzyskano w środowisku kwaśnym z zastosowaniem 0,18 % kwasu solnego.

Słowa kluczowe: lizozym, modyfikacja, rozpuszczalność, funkcjonalność, frakcjonowanie

Wprowadzenie

Lizozym jest enzymem należącym do grupy hydrolaz glikozydowych (E.C. 3.2.1.17). Katalizuje rozkład muraminy – peptydoglikanu będącego składnikiem budulcowym bakteryjnych ścian komórkowych. Jego działanie polega na rozkładzie wiązań β -1,4-glikozydowych między kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetyloglukozaminą i prowadzi do zniszczenia komórki bakteryjnej pozbawionej ściany komórkowej pod wpływem wysokiego ciśnienia osmotycznego. Oprócz właściwości antybakteryjnych enzym wykazuje również wiele innych cennych właściwości, w tym działanie przeciwwirusowe i przeciugrzybiczne [13, 18]. Cząsteczkę lizozymu tworzy pojedynczy łańcuch polipeptydowy zbudowany ze 129 aminokwasów. Grupy polarne

zlokalizowane są na powierzchni cząsteczki i decydują o jej hydrofilowym charakterze, natomiast grupy hydrofobowe zlokalizowane są w jej wnętrzu [7, 24, 28]. W układzie przestrzennym enzymu występują cztery wiązania poprzeczne w postaci mostków disiarczkowych, które determinują jego wysoką termostabilność [9, 28, 29]. W przyrodzie lizozym występuje w większości wydzielin, płynów ustrojowych oraz tkanek ludzkich i zwierzęcych. Jest ważnym składnikiem śliny i łez, znajduje się także we krwi i limfie. Dużą zawartość enzymu stwierdzono w wielu narządach. Wykazano jego obecność również w niektórych roślinach, bakteriach i bakteriofagach. Dzięki właściwościom antibakteryjnym lizozym odgrywa ważną rolę w ochronie treści jaja ptaków przed zanieczyszczeniem mikrobiologicznym. Bogate źródło lizozymu stanowi białko jaja kurzego, w którym jego udział wynosi ok. 3,5 %, stąd stało się ono podstawowym surowcem do przemysłowego pozyskiwania tego enzymu [24, 29, 31].

Lizozym charakteryzuje się wieloma korzystnymi właściwościami umożliwiającymi jego zastosowanie w przemyśle spożywczym; jest dopuszczony do stosowania w produkcji i utrwalaniu żywności [4, 14]. Dzięki wysokiej stabilności termicznej zachowuje aktywność lityczną w szerokim zakresie temperatury, m.in. wobec *E. coli*, co przyczyniło się do jego wykorzystania w konserwacji produktów mięsnych i rybnych [7, 13]. W przemyśle serowarskim używany jest do produkcji serów dojrzewających, jako składnik redukujący liczbę bakterii kwasu masłowego, szczególnie *Clostridium tyrobutyricum*, odpowiedzialnej za tzw. późne wzdęcia serów. Warunkuje poprawę cech sensorycznych sera, nie oddziałując na przebieg procesu produkcyjnego i jego dojrzewanie. Jest także stosowany do produkcji mleka w proszku i odżywek dla niemowląt [16, 27, 30]. Lizozym wykorzystywany jest do monitorowania obecności bakterii kwasu mlekowego w piwie, nie wpływając przy tym na jego właściwości sensoryczne i stabilność piany [5]. Tę samą funkcję spełnia przy produkcji wina, umożliwiając uzyskanie produktu o wysokiej jakości [8]. Skuteczne działa jako czynnik hamujący rozwój tzw. hiochi-bakterii w sake [32]. Ze względu na duże zróżnicowanie produktów spożywczych enzym stosowany jest w różnej formie, m.in. jako dodatek do przetworów, środek powlekający, a także jako składnik roztworów do moczenia lub spryskiwania wyrobów gotowych.

Oprócz zastosowania w przemyśle spożywczym, lizozym wykorzystywany jest również w medycynie i weterynarii, m.in. w leczeniu infekcji bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych, jako lek przeciwbólowy w chorobach nowotworowych, a także w terapii leukemii wywołanej promieniowaniem jonizującym [6, 9, 26]. Enzym istotnie wspomaga terapię antybiotykami, antyseptykami, kortykosteroidami i enzymami proteolitycznymi [13, 15].

W przyrodzie lizozym występuje głównie w postaci monomeru, który działa przede wszystkim na bakterie Gram-dodatnie. Działanie lityczne wobec bakterii Gram-ujemnych jest mocno ograniczone ze względu na to, że ich ściany komórkowe zawie-

rają dodatkowe polipeptydy, lipoproteidy i lipopolisacharydy tworzące warstwę ochronną, która utrudnia dostęp enzymu i może powodować jego inaktywację [18, 25]. Zjawisku temu można przeciwdziałać przeprowadzając modyfikacje lizozymu. Opracowano dotąd szereg metod modyfikacji enzymu, w wyniku których powstają jego oligomeryczne formy o szerszym zakresie aktywności przeciwbakteryjnej [10, 11, 18, 24]. Wykazano, że spolimeryzowany lizozym działa niszcząco na ściany komórkowe bakterii Gram-ujemnych, zachowując pełną aktywność antybakteryjną przeciw bakteriom Gram-dodatnim, a wobec niektórych szczepów jest nawet skuteczniejszy w porównaniu z monomerem [1, 2, 3, 12, 18, 21, 22, 24]. Istnienie enzymu o tak szerokiej aktywności przeciwbakteryjnej umożliwia jego efektywniejsze wykorzystanie w przemyśle spożywczym, medycynie oraz weterynarii.

Jednym z czynników intensywnie wspomagających oligomeryzację jest oddziaływanie wysokiej temperatury. Jak wynika z prac przeprowadzonych w Katedrze Zarządzania Jakością Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, najlepszy dotychczas efekt modyfikacji uzyskano, stosując metodę wysokotemperaturową (95 °C) [19, 20]. Takie warunki prowadzą do powstania, obok dimeru, również trimeru enzymu. Skutkiem oddziaływania wysokiej temperatury jest postępująca denaturacja lizozymu spowodowana zerwaniem wiązań disiarczkowych i rozfałdowaniem białka. Wyeksponowane na powierzchnię cząsteczki reszty tryptofanowe, zwiększając powierzchnię hydrofobową enzymu, prowadzą do jego oligomeryzacji. To z kolei powoduje zmniejszenie właściwej dla monomeru aktywności hydrolitycznej i pojawienie się nowej aktywności antybakteryjnej działającej na bakterie Gram-ujemne [11, 18, 22]. Zmiany denaturacyjne, towarzyszące procesom modyfikacji termicznej, przyczyniają się również do zmniejszenia rozpuszczalności uzyskanych preparatów, co prowadzi do utraty części właściwości przeciwbakteryjnych i w znacznym stopniu ogranicza ich dalsze zastosowanie.

Celem niniejszej pracy było zwiększenie funkcjonalności preparatów otrzymanych metodą wysokotemperaturowej modyfikacji lizozymu poprzez poprawę ich rozpuszczalności.

Material i metody badań

Podstawowym materiałem do badań był preparat termicznie zmodyfikowanego lizozymu otrzymany metodą wysokotemperaturową, opracowaną w Katedrze Zarządzania Jakością Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu [20], który poddano procesowi frakcjonowania.

Frakcjonowanie prowadzono metodą roztwarzania preparatu wyjściowego o stężeniu [%]: 1, 5, 10 i 15 w środowisku wodnym oraz w roztworze 0,5 % kwasu octowego i 0,18 % kwasu solnego. Proces prowadzono w reaktorze analitycznym Syncore Analyst firmy Büchi (Szwajcaria) w temp. 20 °C. Otrzymane zawiesiny wirowano

w wirówce Beckman J-21 C, przez 15 min z prędkością 12 tys. obr./min w celu oddzielenia części rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej. Osady odrzucano, a uzyskane frakcje supernatantu suszono liofilizacyjnie przy użyciu liofilizatora GT3 firmy Leybold-Hareus (Niemcy). Otrzymane po wysuszeniu preparaty poddawano badaniom analitycznym, obejmującym: ocenę składu oligomerycznego, oznaczanie aktywności hydrolytycznej oraz rozpuszczalności w środowisku wodnym. Obliczano również wydajność procesu frakcjonowania.

Określenie udziału oligomerycznych form lizozymu w badanych próbach prowadzono metodą SDS-PAGE [17, 18] przy użyciu aparatu SE-600 (Hoefer Scientific Instruments, USA), w 6 % żelu zagęszczającym, przy natężeniu prądu 60 mA i w 12,5 % żelu rozdzielającym, przy natężeniu 90 mA. Próby o stężeniu 10 mg/ml i objętości 10 μ l наносzono na żel. Po zakończonym rozdziale żel utrwalano przez 60 min w roztworze utrwalającym złożonym z kwasu octowego, metanolu i wody destylowanej w stosunku 1 : 5 : 4, a następnie barwiono przez 20 h w 10 % roztworze kwasu octowego z dodatkiem barwnika Coomassie Brilliant R-250 (Fisher Scientific, USA). Wybarwione żełe odbarwiano w 10 % kwasie octowym. Odbarwione żełe skanowano, a ich obrazy przechowywano jako pliki komputerowe. Ilościowy udział poszczególnych form oligomerycznych lizozymu w badanych preparatach określano densytometrycznie, korzystając z programu komputerowego TotalLab Quant (Nonlinear Dynamics Ltd., USA).

Aktywność hydrolytyczną lizozymu oznaczano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem zjawiska zmniejszenia zmętnienia zawiesiny bakteryjnej *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich Co., USA) w wyniku dodania do niej enzymu [23]. W badaniach używano spektrofotometru Stv VSU-28 (Carl Zeiss, Niemcy). Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 450$ nm, w temp. 21 °C.

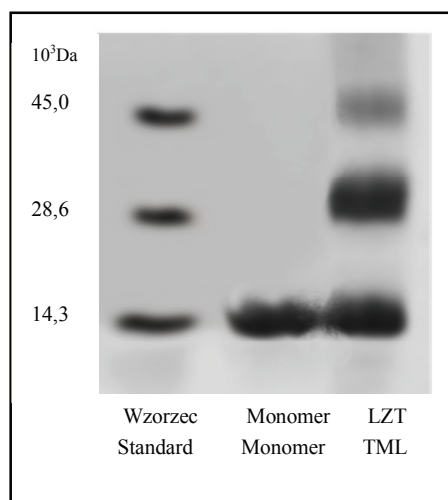
Rozpuszczalność badano metodą suszarkową. Jako rozpuszczalnik stosowano wodę destylowaną.

Wydajność frakcji rozpuszczalnej obliczano, po liofilizacyjnym wysuszeniu prób, z ilorazu masy części rozpuszczalnej i masy preparatu użytego w procesie frakcjonowania.

Wszystkie oznaczenia wykonano w pięciu powtórzeniach. Analizę statystyczną wyników badań przeprowadzono przy użyciu programu Statistica PL 10.0. Wykonano podstawowe obliczenia statystyczne dla każdej zmiennej, wyznaczając wartość średnią, odchylenie standardowe, błąd standardowy i przedział ufności. Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Za statystycznie istotne uznano zależności na poziomie istotności $p = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Badaniom poddano preparat termicznie zmodyfikowanego lizozymu o aktywności hydrolitycznej 3800 U/mg, którego rozpuszczalność wynosiła 41 %. W wyniku analizy elektroforetycznej wykazano, że preparat ten oprócz monomeru lizozymu, zawierał także jego oligomery w postaci dimeru (36,5 %) i trimeru (27,5 %) (rys. 1).



Rys. 1. Obraz elektroforetyczny monomeru lizozymu oraz preparatu lizozymu uzyskanego metodą modyfikacji wysokotemperaturowej (LZT).

Fig.1. Electrophoretic image of lysozyme monomer and preparation of lysozyme produced using high-temperature modification method (TML).

T a b e l a 1

Charakterystyka preparatów zmodyfikowanego lizozymu, otrzymanych przez frakcjonowanie w H₂O.
Profiles of preparations of modified lysozyme produced using fractionation in H₂O.

Próba Sample	Stężenie preparatu Preparation concentration [%]	Udział oligomerów Content of Oligomers [%]	Aktywność hydrolityczna Hydrolytic activity [U/mg]	Rozpuszczalność w wodzie Water solubility [%]	Wydajność procesu Process efficiency [%]
1	1	59,5 ^b	9511 ^a	100	35,2 ^c
2	5	59,1 ^a	9556 ^{ab}	100	35,1 ^c
3	10	59,2 ^{ab}	9608 ^{ab}	100	20,1 ^b
4	15	60,2 ^c	9653 ^b	100	13,5 ^a

Objaśnienie: / Explanatory note:

a - c – wartości średnie oznaczone w kolumnach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,05$; $n = 5$ / mean values in the columns and denoted by different letters differ statistically significantly at $p \leq 0.05$; $n = 5$.

W wyniku przeprowadzonego frakcjonowania uzyskano preparaty (1 - 12), których charakterystykę przedstawiono w tab. 1 - 3. Otrzymane próby zawierały oligomery enzymu w ilości zbliżonej do ich udziału w preparacie poddanym frakcjonowaniu. Preparaty otrzymane w środowisku obojętnym (H₂O) zawierały ich ok. 4 - 5 % mniej, a ich ilość nie zależała od stężenia lizozymu w roztworze (próby 1 - 4). Udział oligomerów w preparatach uzyskanych przez frakcjonowanie w środowisku kwaśnym (0,5 % CH₃COOH i 0,18 % HCl) zwiększał się wraz ze wzrostem stężenia enzymu, osiągając wartości w zakresie 63 - 67 % (próby 5 - 12).

Tabela 2

Charakterystyka preparatów zmodyfikowanego lizozymu, otrzymanych przez frakcjonowanie w 0,5 % roztworze CH₃COOH.

Profiles of preparations of modified lysozyme produced using fractionation in 0.5 % CH₃COOH solution.

Próba Sample	Stężenie preparatu Preparation concentration [%]	Udział oligomerów Content of Oligomers [%]	Aktywność hydrolityczna Hydrolytic activity [U/mg]	Rozpuszczalność w wodzie Water solubility [%]	Wydajność procesu Process efficiency [%]
5	1	62,9 ^a	6122 ^d	87,3 ^d	62,1 ^d
6	5	64,1 ^{abc}	5968 ^c	85,2 ^c	60,4 ^c
7	10	65,3 ^{bc}	5807 ^b	83,6 ^b	33,5 ^b
8	15	65,8 ^c	5652 ^a	81,7 ^a	20,8 ^a

Objaśnienie jak pod tab. 1. / Explanatory note as in Tab. 1.

Tabela 3

Charakterystyka preparatów zmodyfikowanego lizozymu, otrzymanych przez frakcjonowanie w 0,18 % roztworze HCl.

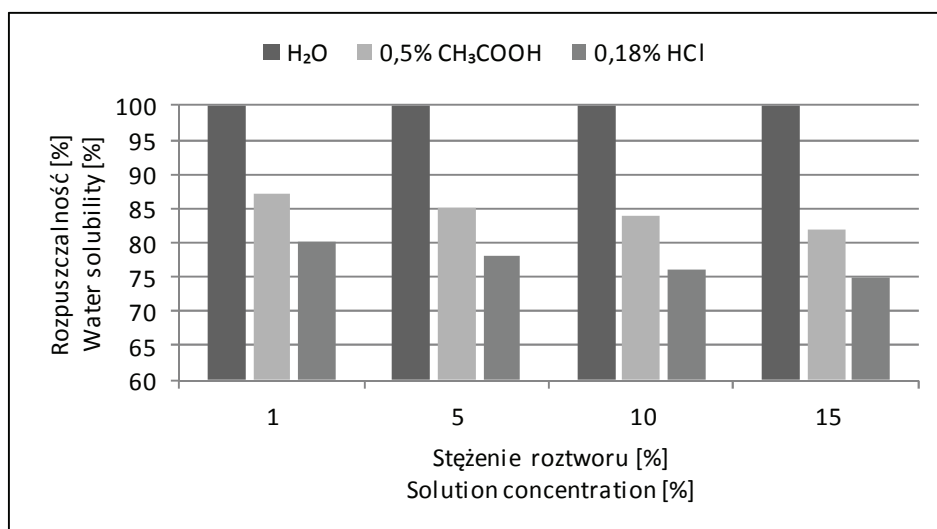
Profiles of preparations of modified lysozyme produced using fractionation in 0.18 % HCl solution.

Próba Sample	Stężenie preparatu Preparation concentration [%]	Udział oligomerów Content of Oligomers [%]	Aktywność hydrolityczna Hydrolytic activity [U/mg]	Rozpuszczalność w wodzie Water solubility [%]	Wydajność procesu Process efficiency [%]
9	1	63,6 ^a	5801 ^d	80,2 ^d	75,8 ^c
10	5	64,2 ^b	5683 ^c	78,2 ^c	75,4 ^c
11	10	65,5 ^c	5561 ^b	76,0 ^b	50,4 ^b
12	15	66,4 ^d	5441 ^a	74,6 ^a	33,3 ^a

Objaśnienie jak pod tab. 1. / Explanatory note as in Tab. 1.

Wszystkie uzyskane preparaty charakteryzowała wyższa, w stosunku do zmodyfikowanego lizozymu, aktywność hydrolityczna. W przypadku preparatów frakcjono-

wanych w środowisku obojętnym była ona najwyższa i wynosiła ok. 9600 U/mg, stanowiąc 2,5-krotność aktywności preparatu wyjściowego. Najniższą aktywność hydrolytyczną wykazywały preparaty uzyskane przez frakcjonowanie w roztworze kwasu solnego (próby 9 - 12). Statystycznie nie wykazano istotnego wpływu stężenia lizozymu w roztworze na aktywność hydrolytyczną otrzymanych preparatów. Oznaczone wartości tego parametru były ściśle związane z rozpuszczalnością otrzymanych preparatów. Aktywność hydrolytyczna była zdecydowanie wyższa w przypadku prób frakcjonowanych w środowisku obojętnym, które niezależnie od stężenia wykazywały 100 % rozpuszczalność w środowisku wodnym. Środowisko kwaśne, w nieznacznie mniejszym stopniu niż środowisko obojętne, wpływało na poprawę rozpuszczalności zmodyfikowanego lizozymu, a dodatkowo powodowało zwiększenie jego aktywności hydrolytycznej. Kwas octowy okazał się lepszym rozpuszczalnikiem od kwasu solnego i korzystniej wpłynął na rozpuszczalność otrzymanych preparatów. Wynosiła ona od 82 % w przypadku roztworu o największym stężeniu lizozymu do 87 % w przypadku roztworu o najmniejszym jego stężeniu i w stosunku do kwasu solnego była wyższa średnio o 7 %. Istotny wpływ rodzaju rozpuszczalnika i stężenia próby na rozpuszczalność uzyskanych preparatów przedstawiono na rys. 2.

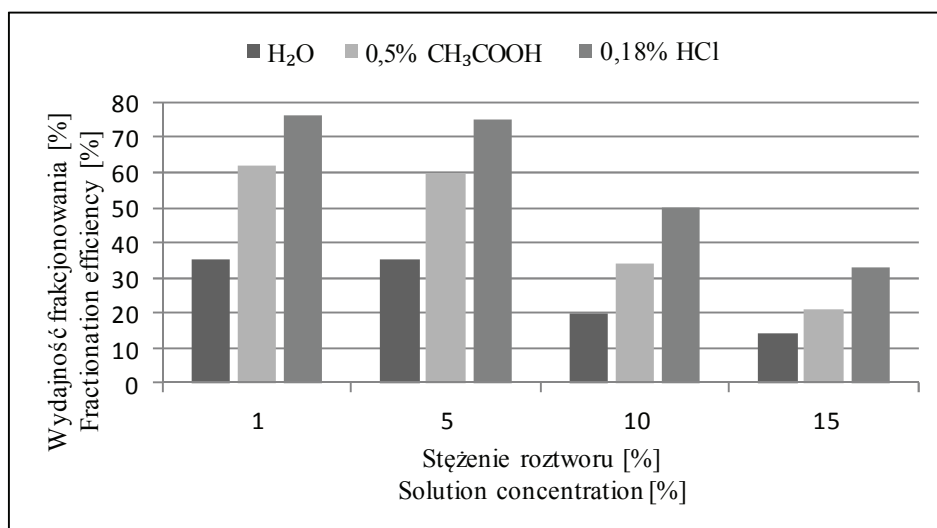


Rys. 2. Rozpuszczalność preparatów zmodyfikowanego lizozymu w zależności od stężenia roztworu i rodzaju rozpuszczalnika zastosowanego w procesie frakcjonowania.

Fig. 2. Solubility of preparations of modified lysozyme depending on the solution concentration and type of solvent used in fractionation process.

W zależności od warunków prowadzenia procesu, frakcjonowanie przebiegało z różną wydajnością (rys. 3). Pomimo całkowitej rozpuszczalności preparatów uzyska-

nych w środowisku obojętnym, proces ten przebiegał z najmniejszą wydajnością dochodzącą do 35 %. Pozyskiwanie preparatów termicznie zmodyfikowanego lizozymu o zwiększonej funkcjonalności, z największą wydajnością przebiegało w środowisku kwaśnym, podczas frakcjonowania w 0,18 % roztworze kwasu solnego przy stężeniu 1 - 5 %. Zastosowanie 0,5 % kwasu octowego również korzystnie wpłynęło na wydajność frakcjonowania. W zakresie stężeń 1 - 5 % obserwowane zwiększenie wydajności – było jednak średnio o ok. 14 % niższe niż podczas rozpuszczania w roztworze kwasu solnego. Spowodowane to było mniejszą rozpuszczalnością zmodyfikowanego lizozymu w roztworze słabszego kwasu, który z kolei w mniejszym stopniu wpłynął na rozpuszczalność otrzymanych preparatów w środowisku wodnym. Znaczne zmniejszenie wydajności stwierdzono w próbach o stężeniu powyżej 5 %. Nasylenie roztworu powodowane dalszym wzrostem stężenia sprawiało, że znaczna ilość aktywnego enzymu wytrącała się w postaci osadu, co w negatywny sposób wpłynęło na wydajność procesu.



Rys. 3. Wydajność frakcjonowania w zależności od stężenia roztworu i rodzaju rozpuszczalnika zastosowanego podczas procesu.

Fig. 3. Efficiency of fractionation depending on solution concentration and type of solvent used during process.

Dzięki zastosowaniu proponowanej metody poprawy funkcjonalności termicznie zmodyfikowanego lizozymu uzyskano dobre efekty w przypadku każdego z przedstawionych sposobów frakcjonowania enzymu. Otrzymane preparaty charakteryzowały się bardzo wysoką, a nawet całkowitą rozpuszczalnością w środowisku wodnym, co

stanowi podstawę ich dalszego praktycznego wykorzystania. Preparaty te wykazywały także wysoką aktywność hydrolityczną oraz zawierały formy oligomeryczne w ilości porównywalnej z ich zawartością w preparacie otrzymanym bezpośrednio po wysokotemperaturowej modyfikacji enzymu.

Stwierdzono, że przedstawiony w pracy sposób poprawy właściwości termicznie zmodyfikowanego lizozymu jest skuteczną metodą zwiększenia jego funkcjonalności i może być wprowadzony jako jeden ze standardowych etapów procesu modyfikacji enzymu.

Wnioski

1. Frakcjonowanie preparatu termicznie zmodyfikowanego lizozymu metodą roztwarzania w środowisku obojętnym jest skuteczną metodą zwiększania jego funkcjonalności. Uzyskane preparaty charakteryzuje całkowita rozpuszczalność oraz wysoka aktywność hydrolityczna.
2. Frakcjonowanie w środowisku kwaśnym zapewnia znaczną poprawę rozpuszczalności preparatu lizozymu i 1,5-krotnie zwiększa jego aktywność hydrolityczną.
3. Ze względu na poprawę właściwości funkcjonalnych frakcjonowanie najkorzystniej jest prowadzić w środowisku obojętnym, a ze względu na wydajność procesu – w środowisku kwaśnym.
4. Z uwagi na straty aktywnego enzymu i zmniejszoną wydajność procesu, frakcjonowanie należy prowadzić z roztworów o stężeniu lizozymu nie większym niż 5 %.

Literatura

- [1] Cegielska-Radziejewska R., Leśniewski G., Kijowski J.: Antibacterial activity of lysozyme modified by membrane technique. *EJPAU, Food Sci. Technol.*, 2003, **6** (2), 1-6.
- [2] Cegielska-Radziejewska R., Leśniewski G., Kijowski J.: Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations - a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2008, **58** (1), 5-10.
- [3] Cegielska-Radziejewska R., Leśniewski G., Kijowski J.: Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. *Eur. Food Res. Technol.*, 2009, **228**, 841-845.
- [4] Cunningham F.E., Proctor V.A., Goetsch S.I.: Egg-white lysozyme as food preservative. *Poult. Sci. J.*, 1991, **47**, 142.
- [5] Daeschel M.A., Bruslind L., Clawson J.: Application of the enzyme lysozyme in brewing. *Master Brewer's Association of the Americas Technical Quarterly*, 1999, **36** (2), 219-222.
- [6] Danyluk B., Kijowski J.: Wpływ monomeru lizozymu na rozwój bakterii *Clostridium tyrobutyricum*. *Przem. Spoż.*, 2001, **12**, 16-19.
- [7] Davis C., Reeves R.: High value opportunities from the chicken egg. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation, 2002: (<http://www.rirdc.gov.au/reports/EGGS/02-094.pdf>).
- [8] Gerbaux V., Villa A., Monamy C., Bertrand A.: Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1997, **48** (1), 49-54.

- [9] Gołąb K., Warwas M.: Białka jaja kurzego - właściwości biochemiczne i zastosowania. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2005, **14** (5), 1001-1010.
- [10] Ibrahim H.R., Hatta H., Fujiki M., Kim M., Yamamoto T.: Enhanced antimicrobial action of lysozyme against Gram-negative and Gram-positive bacteria due to modification with perillaldehyde. *Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1813-1817.
- [11] Ibrahim H.R., Higashiguchi S., Juneja L.R., Kim M., Yamamoto T.: A structural phase of heat – denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 1416-1420.
- [12] Kijowski J., Cegielska-Radziejewska R., Leśniewski G.: Antibacterial action of modified hen egg white lysozyme. *World Poult. Sci. J.*, 2006, **62**, 162-168.
- [13] Kijowski J., Leśniewski G.: Wykorzystanie lizozymu do utrwalania żywności w diagnostyce medycznej i farmakologii. *Biotechnologia*, 1995, **2** (29), 130-140.
- [14] Kijowski J., Leśniewski G.: Separation, polimer formation and antibacterial activity of lysozyme. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1999, **3**, 3-16.
- [15] Kopeć W., Trziszka T.: Lizozym i jego charakterystyka. Izolacja i możliwości praktycznego zastosowania. *Przem. Spoż.*, 1997, **3**, 36-37.
- [16] Koterska B., Poznańska S., Lewicki C., Ryduzik W.: Inhibition of butyric acid fermentation in cheese by addition of lysozyme in the form of egg-white. *Dodatek Naukowy*, 1972, **4**, 5-7.
- [17] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (5259), 680-685.
- [18] Leśniewski G.: Fizykochemiczne metody modyfikacji i pomiaru aktywności lizozymu. *Rozpr. nauk. Wyd. AR w Poznaniu, Poznań 2007*, 387, ss. 1-104.
- [19] Leśniewski G.: Nowe sposoby fizykochemicznej modyfikacji lizozymu. *Nauka. Przyroda. Technologie*, 2009, **3** (4), 1-18.
- [20] Leśniewski G., Borowiak R.: Wysokotemperaturowa modyfikacja lizozymu. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 2010, **9** (2), 23-32.
- [21] Leśniewski G., Cegielska-Radziejewska R., Kijowski J.: Antibacterial activity of thermally modified lysozyme. *EJPAU, Food Sci. Technol.*, 2001, **2**, 1-9.
- [22] Leśniewski G., Cegielska-Radziejewska R., Kijowski J.: Thermally and chemical-thermally modified lysozyme and its bacteriostatic activity. *World Poult. Sci. J.*, 2004, **60**, 303-310.
- [23] Leśniewski G., Kijowski J.: Metody badania aktywności enzymatycznej oraz oznaczanie ilościowe lizozymu z białka jaja kurzego. *Przem. Spoż.*, 1995, **12**, 476-479.
- [24] Leśniewski G., Kijowski J.: Lysozyme. In: *Bioactive Egg Compounds*. Eds.: R. Huopalathi, R. Lopez, M. Anton, R. Schade. Springer-Verlag, Berlin 2007, pp. 33-42.
- [25] Ohno N., Morrison D.C.: Effects of lipopolysaccharide chemotype structure on binding and inactivation of hen egg lysozyme. *Eur. J. Biochem.*, 1989, **186**, 621-627.
- [26] Proctor V.A., Cunningham F.E.: The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1988, **26** (4), 359-395.
- [27] Stadhouders J., Stegink H., Van den Berg G., Van Ginkel W.: The use of lysozyme to prevent butyric fermentation in gouda Cheese. The limited effect of the enzyme. *Meijeritieteellinen Aikakauskirja*, 1987, **44** (1) 23-35.
- [28] Tomizawa H., Yamada H., Imoto T.: The mechanism of irreversible inactivation of lysozyme at pH 4 and 100 °C. *Biochemistry*, 1994, **33**, 130-132.
- [29] Trziszka T., Kopeć W.: Lizozym i jego charakterystyka. *Przem. Spoż.*, 1997, **1**, 41-43.
- [30] Wasserfall F.E., Voss E., Prokopek D.: Studies on cheese ripening. V. The use of lysozyme instead of nitrate to inhibit late blowing of cheese. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.*, 1976, **28**, 3-16.
- [31] Wisłowska M., Smirnow J.: Lizozym i jego znaczenie biologiczne. *Reumatologia*, 2000, **38** (3), 368-372.

- [32] Yajima M., Hidaka Y., Matsuoka Y.: Studies on egg-white lysozyme as a preservative of sake. *J. Ferment. Technol.*, 1968, **46**, 782-788.

**ATTEMPT TO INCREASE FUNCTIONALITY OF PREPARATIONS PRODUCED
BY HIGH-TEMPERATURE MODIFICATION OF LYSOZYME**

S u m m a r y

Lysozyme is a hydrolytic enzyme with potent antibacterial activity; its modification further enhances this effect. The modified enzyme shows an improved usability, thus, providing for wider practical utilization thereof. In the hitherto studies on lysozyme, several lysozyme modification methods have been developed including thermal and thermo-chemical methods. A side effect of this type of modification is partial irreversible enzyme denaturation. It induces the worsening of properties of the modified lysozyme and, as a result of its decreased solubility in the water environment, it reduces the practical application of the produced preparations. The objective of this study was an attempt to increase the functionality of thermally modified enzyme through the elimination of insoluble fraction from the preparation. The fractionation performed in a neutral environment resulted in producing a preparation of a complete solubility and hydrolytic activity of 10 000 U/mg. The highest efficiency of the fractionation process (75 %) was achieved in an acidic environment with the use of a 0.18 % hydrochloric acid.

Key words: lysozyme, modification, solubility, functionality, fractionation ☒